

PCT/FR 98/02042
09/509188

BREVET D'INVENTION

REC'D	19 OCT 1998
WIPO	PCT

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 OCT 1998

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

881802180



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

cerfa
N° 55 -1328

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télecopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

23 SEP 1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 11812 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

23 SEP. 1997

DATE DE DÉPÔT

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale

n°du pouvoir permanent références du correspondant

236535 D17043 FFP

téléphone

01 45 00 92 02

date

Établissement du rapport de recherche

 différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Promoteur spécifique des microspores et procédé d'obtention de plantes hybrides

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Forme juridique

ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTÈRE SCIENTIFIQUE ET TECHNO...

Nationalité (s) Française

Pays

Adresse (s) complète (s)

FR

145, rue de l'Université 75007 PARIS

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

 oui non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

 requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92-1001

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 11812

TITRE DE L'INVENTION : **Promoteur spécifique des microspores et procédé d'obtention de plantes hybrides**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
145, rue de l'Université 75007 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DROUAUD Jan
7, rue du Général Leclerc
78000 Versailles, FR

FOURGOUX Agnès
chemin des quatre Arpents
78330 Fontenay Le Fleury, FR

PELLETIER Georges
28, avenue de l'Espérance
91440 Bures sur Yvette, FR

GUERCHE Philippe
7, rue Marceau
92170 Vanves, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

23 septembre 1998

CABINET REGIMBEAU

J. S.
92-1001

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

~~ORIGINAL~~

1

La présente invention concerne notamment un promoteur spécifique des microspores et un procédé d'obtention de plantes hybrides.

La microspore correspond à un stade précis du développement du gamète mâle chez les plantes supérieures. La gamétogenèse mâle a lieu dans un organe spécialisé, l'anthère, et comprend *sensu stricto* la différenciation de cellules diploïdes en grains de pollen haploïdes. Chaque cellule diploïde appelée cellule sporogène subit une méiose pour produire quatre microspores haploïdes qui se différencient par la suite pour donner des grains de pollen matures.

Connaître et savoir manipuler les facteurs moléculaires qui contrôlent le développement de la microspore est un enjeu considérable non seulement d'un point de vue de la recherche fondamentale mais aussi d'un point de vue de l'amélioration des plantes. En effet, cette connaissance permet de maîtriser la production de grains de pollen et par conséquent la reproduction de la plante.

Une telle maîtrise passe par l'obtention de plantes totalement stériles pour 15 l'un de leur gamète de façon à empêcher l'autofécondation.

Jusqu'à présent, la stérilité mâle des plantes, moins complexe que la stérilité femelle, a été largement étudiée mais nécessite l'utilisation de systèmes génétiques relativement lourds à mettre en œuvre pour la production commerciale de semences hybrides. Un type de stérilité mâle très utilisée est la stérilité mâle cytoplasmique qui consiste en l'obtention :

- d'une lignée femelle dont le caractère mâle-stérile est transmis par le cytoplasme ; on appelle un tel cytoplasme un "cytoplasme inducteur de stérilité mâle" ; ces "cytoplasmes inducteurs" pour une espèce donnée sont en général soit découverts dans la nature, soit observés parfois chez des plantes résultant de croisements interspécifiques (fécondation croisée, fusion de protoplastes etc...),
- d'une lignée "mainteneuse" de stérilité dont le cytoplasme est normal, et

d'une lignée restauratrice de fertilité si l'on récolte les graines et/ou les fruits de la plante hybride.

Dans la lignée femelle (porteuse du cytoplasme inducteur de stérilité) tous les grains de pollen sont tués. Il est donc nécessaire pour multiplier et améliorer cette lignée de disposer d'une lignée ne portant ni le cytoplasme inducteur (donc produisant des grains de pollen) ni le gène de restauration. Cette lignée est dite "mainteneuse" de stérilité car le croisement avec la lignée femelle donne une descendance entièrement femelle.

La restauration de la fertilité est réalisée dans l'hybride par le croisement du parent femelle (portant le cytoplasme mâle stérile) avec le parent comprenant un gène nucléaire de la restauration (la lignée restauratrice), ce croisement permettant l'obtention de plantes hybrides fertiles qui produiront des graines par autofécondation.

Dans le cas de la stérilité nucléaire sporophytique, il a été décrit, par exemple, des systèmes permettant de tuer les cellules mères des microspores au moyen d'une RNase et par conséquent d'obtenir des plantes dépourvues de gamètes mâles. La fertilité est restaurée au moment du croisement de la lignée ne produisant plus de gamètes mâles avec une autre lignée portant un inhibiteur de la RNase, les graines résultant de ce croisement comprenant à la fois le gène cytotoxique et son inhibiteur.

La présente invention propose quant à elle d'obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique et incapables de produire des grains de pollen. Elle consiste à mettre en œuvre une région promotrice contrôlant l'expression spécifiquement dans les microspores d'un gène codant pour une molécule cytotoxique tout en disposant d'un moyen permettant l'inhibition contrôlée de cette toxicité afin d'obtenir une lignée de plantes génitrices homozygotes totalement stériles quant à leurs gamètes mâles et ensuite obtenir des plantes hybrides fertiles (produisant un grain de pollen viable sur deux), donc capables de

produire des graines, sans avoir recours à l'utilisation d'un gène de restauration de la fertilité.

Jusqu'à présent, un seul gène s'exprimant spécifiquement dans la microspore a été décrit chez le tabac (Oldenhof et al., 1996). Ce gène ne possède pas d'homologue chez les Brassicacées comme cela résulte d'une expérience de Southern blot sur de l'ADN génomique de *Brassica oleracea* (données non montrées).

La présente invention a donc pour objet une séquence nucléotidique dont il a été démontré que le gène correspondant s'exprime spécifiquement dans la microspore, cette séquence nucléotidique correspond à SEQ ID N° 3.

Par conséquent, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :

- a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
- b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
- c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).

Dans le cadre de la présente invention, la partie la plus intéressante de cette séquence nucléotidique est la région promotrice définie comme étant la séquence précédant (côté 5') le codon de début de traduction (ATG). Cependant, au stade actuel des connaissances de la séquence nucléotidique selon SEQ ID N° 3, trois ATG ont été mis en évidence. Un en position 1965, un autre en position 2085 et un troisième en position 2112. Il semblerait que l'ATG fonctionnel soit celui situé en position 2085. Ceci n'est cependant pas confirmé, c'est la raison pour laquelle la plus grande région promotrice envisageable concernant SEQ ID N° 3 s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 2111 et préférentiellement du nucléotide 1 au nucléotide 2084.

Cette région promotrice précède donc, à l'état naturel, une séquence codante (orf) qui est exprimée spécifiquement dans les microspores et dans le cas où cet orf est remplacé (par manipulation génétique) par un autre orf dont le

produit est une molécule cytotoxique, cette dernière est susceptible de ne détruire que lesdites microspores.

La présente invention a donc également pour objet des vecteurs d'expression cellulaire comprenant une séquence promotrice telle que ci-dessus décrite placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.

Avantageusement, le produit cytotoxique en question est une protéase. En effet, lorsque la protéase s'exprimera spécifiquement dans les microspores, elle en détruira toutes les protéines, ce à quoi la microspore ne pourra pas survivre.
10 Préférentiellement, la protéase est une subtilisine et en particulier la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*. Cette subtilisine BPN' fait partie de la famille des subtilisines que l'on trouve chez de nombreux organismes et qui sont des protéases connues pour couper les protéines au niveau des séries.

Il s'agit donc d'introduire un vecteur conforme à l'invention dans une souche bactérienne susceptible de réaliser la transformation de cellules de plantes telle qu'*Agrobacterium tumefaciens*. Ceci peut notamment être réalisé par la méthode d'infiltration de plantes d'*Arabidopsis thaliana* décrite par Bechtold et al., 1993. Cette technique consiste à introduire la bactérie dans les cellules des hampes florales par infiltration sous vide. Les plantes sont ensuite repiquées en serre et leur graines récoltées. Environ une graine sur mille donnent naissance à des plantes dont toutes les cellules portent le transgène. La transformation d'autres plantes, et notamment du colza, peut être réalisée par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* et/ou *Agrobacterium rhizogenes* à l'aide de diverses techniques, maintenant classiques (transformation de disques foliaires, d'hypocotyles, de hampes florales etc...) associant une phase de coculture de la bactérie avec les tissus végétaux, suivie de la sélection et de la régénération des cellules transformées en plantes entières. D'autres techniques de transformation ne font pas intervenir cette bactérie et permettent de transférer directement le gène cloné dans des cellules ou des tissus (electroporation, canon à particules etc...) et

de sélectionner et d'obtenir des plantes transformées (revue par Siemens and Schieder).

La présente invention a également pour objet les cellules de plantes transformées par un vecteur conforme à l'invention ainsi que des plantes 5 comprenant lesdites cellules.

L'invention a également pour objet des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.

Comme indiqué précédemment, la présente invention permet donc 10 l'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique inhibant toute production de grains de pollen. Cependant, ces plantes homozygotes quant à leur stérilité mâle ne peuvent être obtenues qu'après autofécondation de plantes préalablement transformées par un vecteur conforme à l'invention, c'est-à-dire 15 hémizygotes quant à leur stérilité mâle et chez lesquelles on a restauré provisoirement la fertilité des grains de pollen porteurs de la stérilité gamétophytique pour leur permettre de réaliser une autofécondation.

Un moyen d'obtenir des plantes homozygotes pour ce gène serait d'utiliser 20 la gynogenèse, technique qui consiste à régénérer des plantes haploïdes doublées à partir de culture d'ovules ou d'ovaires. Il s'agit dans ce cas d'obtenir la formation d'une plante homozygote diploïde à partir du gamète femelle haploïde. La 25 gynogenèse est applicable à un certain nombre d'espèces végétales mais il n'est pas envisageable de produire un grand nombre de plantes homozygotes pour le transgène en question par cette technique, car sa mise en œuvre est délicate et son efficacité reste le plus souvent très faible.

La présente invention concerne également un procédé d'obtention de 25 plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :

- l'insertion dans des plantes de lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et

- l'obtention des plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

Plus particulièrement, le procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible conforme à l'invention comprend les étapes de :

- 5 a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention,
- b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la cytotoxicité du produit,
- c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
- 10 d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
- e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).

Ainsi, à l'étape a) du procédé ci-dessus, on transforme une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention c'est-à-dire comprenant une séquence 15 promotrice spécifique des microspores placée en amont d'un gène codant pour un produit cytotoxique. Les plantes résultant de cette transformation comprennent toute l'ADN en question dont le gène ne s'exprime que dans les microspores. Cependant, à ce stade, la plante étant diploïde au moment de la transformation, elle devient hétérozygote quant à sa stérilité mâle et n'est donc capable, après 20 transformation, de donner lieu qu'à 50 % de microspores viables (les 50 % autres étant détruits suite à l'expression du transformant).

A l'étape b), la restauration ou l'induction de la fertilité perdue par la plante transformée est donc ensuite réalisée par l'inhibition de la toxicité du produit du gène transformant.

25 Ceci peut se faire de diverses manières, cependant, dans le cas où le produit cytotoxique en question est une subtilisine et en particulier, la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*, l'inhibition est réalisée par l'action sur la plante transformée d'une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés (n'ayant donc *a priori* pas d'action sur les plantes). En effet, cette molécule

appliquée durant l'anthèse, est susceptible de restaurer la fertilité totale des plantes hémizygotes par inhibition de la subtilisine. Elle peut par exemple être appliquée au pied de la plante et atteindre tous les tissus. Comme un insecticide, elle ne devrait avoir aucun effet sur la plante, cependant, elle jouera son plein effet au niveau des microspores, seuls organes exprimant la subtilisine.

Ensuite, à l'étape c), on procède à l'autofécondation des plantes dont la fertilité a été restaurée puis, à l'étape d), on sélectionne les plantes homozygotes quant à la stérilité mâle et par conséquent totalement stériles en l'absence de traitement c'est-à-dire d'inhibition du produit cytotoxique.

Les plantes ainsi obtenues, incapables de produire des gamètes mâles mais toujours capables de produire des gamètes femelles, c'est-à-dire des ovules, peuvent donc être croisées avec une autre lignée de plantes totalement fertiles et présentant des caractéristiques agronomiques intéressantes. Dans ce croisement, la plante homozygote quant à la stérilité mâle joue le rôle de parent femelle tandis que l'autre plante joue le rôle de parent mâle. L'hybride résultant de ce croisement est hémizygote quant à la stérilité mâle et est donc susceptible de produire 50 % de grains de pollen viables (les autres portant le transgène sont donc détruits par le produit cytotoxique). Une production de 50 % du pollen est amplement suffisante pour donner lieu à des graines présentant les qualités de chacune des lignées croisées que l'on cherchait précisément à associer.

La présente invention concerne donc également un procédé d'obtention de plantes hybrides caractérisé en ce qu'il comprend le croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique comme ci-dessus décrit avec des plantes de lignée B d'intérêt agronomique. Elles concernent également les graines issues des plantes hybrides ainsi obtenues.

Avantageusement, les plantes conformes à l'invention appartiennent à la famille des Brassicacées ; préférentiellement, il s'agit du colza.

Par ailleurs, il est à souligner que la région promotrice conforme à l'invention peut également être mise en œuvre dans des stratégies d'inactivation de

gène par utilisation d'éléments mobiles tels que les transposons et rétrotransposons.

En effet, ceci peut être réalisé dans le but d'isoler des plantes présentant un génotype mutant stable et d'isoler de très nombreux mutants différents et 5 indépendants.

Il s'agit de créer une séquence chimérique constituée d'une région promotrice conforme à l'invention et de la séquence, en tout ou partie, d'un élément mobile. L'expression de cet élément mobile, réduite à la phase de développement de la microspore, devrait permettre d'induire quelques mutations 10 dans le génome des grains de pollen de la plante transformée. Il est alors possible, dans la descendance obtenue à partir de ces grains de pollen, d'isoler des individus ne portant plus le transgène mais seulement une ou plusieurs mutations issues de phénomènes de transposition. Le principe est de provoquer, grâce à la susdite région promotrice, l'activation de la transposition de ces éléments mobiles pendant 15 un temps très court (la microsporogénèse) dans une multitude de cellules gamétiques et supprimer à la génération suivante les plantes qui portent le transgène (à savoir la région promotrice + la séquence permettant l'activation de la transposition) de façon à ce que le cycle ne recommence pas. Il s'agit ensuite de rechercher, dans la descendance et par divers techniques, les plantes pour 20 lesquelles les éléments mobiles ont provoqué des mutations en s'insérant dans les gènes. L'étude de ces plantes permettrait notamment de comprendre la fonction du gène muté.

Parmi les éléments mobiles susceptibles d'être ainsi utilisés, on peut citer les rétrotransposons de types Tnt1, Tto1, Tnp-2, Tos10-17, Bs1, BARE-1, Ta-1, 25 etc... ou les transposons de type Ac/Ds, Spm, Mu, etc...

La figure 1 illustre l'alignement des séquences des deux ADNc M3 (SEQ ID N° 1) et M3.21 (SEQ ID N° 2) issues des criblages de la banque ADNc de microspore de *Brassica napus* cv.Brutor. Les codons de début (ATG) et de fin (TGA) de la séquence codante putative sont soulignées.

La figure 2 donne la séquence nucléotidique du clone BnM3.4 (SEQ ID N° 3) dont l'ADNc de M3 serait issu. L'ATG en gras (position 2085) est celui qui a la plus forte probabilité d'être l'ATG fonctionnel. L'ATG souligné en position 2112 est celui qui est présent dans la séquence de l'ADNc de M3.21. L'ATG souligné en position 1965 est le premier ATG rencontré. La séquence précédant ces ATG est considérée par conséquent comme la région promotrice du gène BnM3.4.

La figure 3 illustre l'hybridation de type Northern blot avec la sonde M3 marquée au 32 P sur des ARN totaux (10 µg par puits) extraits de différents tissus de colza. A : boutons de 0-2 mm (méiocytes) ; B : boutons de 2-3 mm (microspores uninucléées) ; C : boutons de 3-4 mm (microspores binucléées) ; D : boutons supérieurs à 4 mm (grains de pollen matures) ; E : sépales de colza ; F : pistils de colza ; G : boutons de colza mâle stérile ; H : boutons entiers de colza.

La figure 4 illustre la préparation du plasmide pJD51 de 7152 pb à partir du plasmide pAF1 de 5 135 pb (plasmide d'origine : pBluescript SK- PROMEGA) et du plasmide pBnB2 de 5458 pb (plasmide d'origine pBS SK- PROMEGA).

La figure 5 illustre la préparation du plasmide pJD101 de 19670 pb à partir du plasmide pEC2 de 15400 pb dérivé du plasmide pDHB 321.1, (D. Bouchez, communication personnelle) et du plasmide pJD51 (cf figure 2).

La figure 6 représente un schéma de sélection de variétés hybrides d'une plante (colza par exemple) faisant appel à un système de stérilité mâle gamétophytique avec induction de la fertilité. SMGfi : stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible ; Induction F : induction de la fertilité ; AF : autofécondation.

L'invention ne se limite pas à la seule description ci-dessus, elle sera mieux comprise à la lumière des exemples ci-après qui ne sont cependant donnés qu'à titre purement illustratif.

EXAMPLE 1 : Mise en évidence d'un promoteur spécifique des microspores

La première étape a consisté en l'obtention de clones d'ADN complémentaires (ADNc) exprimés spécifiquement dans la microspore de colza. Pour cela, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARN messagers (ARNm) de microspores de colza. Parallèlement, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm de boutons floraux de colza mâles stériles. Les ADNc provenant desdits boutons floraux ont été soustraits des ADNc dérivés des ARNm exprimés dans la microspore de colza. Les molécules résultant de cette soustraction ont été utilisées lors d'une expérience d'hybridation différentielle d'une banque d'ADNc de microspore selon une technique similaire à celle présentée par Atanassov et al. (1996).

L'un de ces clones isolés, l'ADNc M3 (SEQ ID N° 1) s'est avéré être le représentant d'un ARNm spécifiquement exprimé dans la microspore de colza. Un autre ADNc, nommé M3.21 (SEQ ID N° 2) a été trouvé par criblage de la banque avec l'ADNc M3. Les séquences de ces deux ADNc présentent 89 % d'identité (figure 1), ils sont issus visiblement d'une famille de gènes très proches, exprimés spécifiquement dans la microspore.

Le clone d'ADNc M3 a servi de sonde pour cribler une banque d'ADN génomique de colza commercialisée par CLONTECH Laboratories, Inc., 4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303-4607, USA ; deux clones (BnM3.4 et BnM3.2) correspondants à deux gènes différents ont été isolés. L'ADNc M3 serait issu du gène BnM3.4 (SEQ ID N° 3) car celui-ci porte un orf identique à l'ADNc M3 (figure 2). Ce gène ne possède pas d'intron. Suffisamment de résultats expérimentaux laissent à penser que l'ADNc M3.21 ne serait pas issu du deuxième gène isolé (BnM3.2) qui porte bien une région correspondant à la séquence de l'ADNc M3.21, mais à un troisième gène, très proche du gène BnM3.2.

La région promotrice de ce gène est définie comme étant la séquence immédiatement en amont du codon de début de traduction (ATG).

EXAMPLE 2 : Vérification de la spécificité du promoteur du gène BnM3.4

A/ Northern blot

Une analyse par Northern blot a été effectuée avec 10 µg d'ARN total de sépales, de pistil, de boutons entiers, de boutons de plante mâle stérile, de méiocytes, de microspores, de grains de pollen binucléés et de grains de pollen trinucléés, hybridés avec l'ADNc-M3. Une bande de 1 kb correspond au transcrit du gène BnM3.4 et aussi au transcrit M3.21, puisqu'ils ont des séquences très proches. Ces transcrits sont uniquement présents dans les deux premiers stades de la gaméto-génèse mâle dont les produits sont difficiles à isoler parfaitement de façon expérimentale (figure 3).

Les protéines déduites de ces deux clones d'ADNc sont évidemment très proches et sont riches en glycine et proline. Elles ne sont strictement identiques à aucune autre protéine des banques de données mais interviennent certainement dans la constitution de la paroi.

B/ Transformation par un gène chimérique

Différents gènes chimériques (c'est-à-dire constitués de la séquence codante d'un gène connu précédée de la région promotrice conforme à l'invention) ont été construits afin d'étudier la spécificité spatio-temporelle du promoteur de BnM3.4.

La figure 4 présente la construction d'un vecteur bactérien pJD51 associant un fragment du promoteur BnM3.4 avec la séquence codante du gène de la β-glucuronidase. Le plasmide pAF1 contenant la séquence codante de β-glucuronidase et la séquence de terminaison de transcription du gène NOS d'*Agrobacterium tumefaciens* a été digéré par les enzymes BamHI et ClaI. Le plasmide pBnB2 contient un fragment BamH1-BamH1 de 6 kb issu du clone d'ADN génomique BnM3.4 et dans lequel est présent le gène BnM3.4. Un fragment correspondant à la plus grande région promotrice possible compte tenu des sites de restriction (2056 pb) a été isolé du plasmide pBnB2 par une double digestion BamHI-NspV et inséré entre les sites BamHI et ClaI (compatible avec NspV) du plasmide pAF1.

Le gène chimérique ainsi construit a été isolé par une digestion NotI du plasmide pJD51 pour être cloné dans un plasmide binaire *d'Agrobacterium tumefaciens* : pEC2 ouvert par l'enzyme NotI (figure 5).

Le plasmide binaire pJD101 contenant le gène chimérique a été introduit
5 dans la souche C58C1 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al.
1986) par électroporation et les transformants possédant le pJD101 ont été
10 sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine. Un de ces transformants
d'Agrobacterium a été utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana* (écotype
Wassilevskja) par la méthode d'infiltration des hampes florales décrite par
15 Bechtold et al. 1993. Les plantes transformées sont sélectionnées grâce à leur
résistance à la phosphinothrycine, conférée par un gène de résistance inséré
conjointement dans l'ADN-T.

Parmi ces plantes, certaines présentent une expression de la β -
glucuronidase spécifiquement dans les microspores (mis en évidence par une
15 coloration bleue lors de l'ajout d'un substrat spécifique de la β -glucuronidase, le
X-Glu). Aucune coloration n'est présente dans les tissus adjacents de l'anthère de
même que dans les tissus somatiques de la plante. Chez une plante transformée
hémizygote pour le gène chimérique, la moitié des microspores produites sont
bleues car elles seules contiennent le gène chimérique.

20 La spécificité d'expression conférée par cette séquence promotrice de 2 kb
est bien restreinte, dans les limites de la sensibilité de la technique, à un seul type
cellulaire et à partir du stade microspore.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INRA (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE)
 (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
 (C) VILLE: PARIS
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Promoteur spécifique de microspores et procédé d'obtention de plantes hybrides

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 497 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: M3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTGGATCTT TCCATGACCC CTTCTTGACC GGCTATGTCA AGCTACATTG CTCCACCGTT	60
GTTGGATCTA CTTCACCTCC TCCTTCACAG GCTCCTTAC ATGCTCCTTC TTCACAGGCT	120
CCTTCACATG CTCCTTCACA TGCTCCTTCA CAGGCTCCTT TAAATGCTCT TTTAAATGCT	180
CCTTTACATG CTCCTTTACA TGCTCCTTCA CAGGCCCTT CACAGGCCCTT TTCACAGGCC	240
CCTTTACATG CTCCTTTACT GCCCCCTTCG CAGGCTCCTT CACCGGCTCA GTGATTTAGC	300
TATTTGATAG AATTACTCAA GTAATGATGC CCTAGGGAGT TTGAGTTTT CTCGTGTTT	360

AAAGTTTGT GTTTATTTG AGAAAACCGT CTTGGATT TAACTCACT TTGATTTTT	420
CCCTTATACA ATTTAAATT AGAGTTACT TATTAATTAA TAAATTAGA TGGTACTAAG	480
TTTTATCAT AATAAAA	497

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 674 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: M3.21

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TCTTGCTATG ATTTCTTCA TAAGATGTGT CACATCCAAA GTCACAGCAA CAGAACTAGA	60
GTCATCAACT AACCAAGAGC TCTTCCTATC GCGGCACTTG CCTCGCTTTC ACCCCAAGCC	120
ACATTGGCCG TTCTGTGGCT CCGGAAAAGC CTTCCCTGCA GGCCACTTCC GACCAACTCC	180
GTTCCATCTG CCACAGGAAG TCACCAGATG CTTGTCCGAC AAGAAGGAGG TAGGTACATG	240
TTTGATGAT ATCGTTGAGA CTTTCTTCAC CAGGAAAGCC GTTATTGGAT CGGAATGTTG	300
CGCCCGGATC AAGAAGATGA ACAAAAGATTG TGAGAAGACC GTCTTGGAT CTTCCATGA	360
CCCCTCTTG ACAGGCTATG TCAAACATACA TTGCTCCACC GTTGTGGAT CTACTTCACC	420
TCCTCCTTCA CATGCTCCTT CACAGGCTCC TTTACATGCT CCTTCACAGG CTCCCTTACA	480
TGCCCTTCA CAGGCTCCTT TACTGCCCTC TTCACAGCCT CTCCCACCGG CTCAGTGATT	540
TTAGCTATT GTTAGAATT TTCAAGTGT GATGTCCTAG GGAGTTTAG GTTTTCTTG	600
TTTTAAATT TTGTGTTAT TTTGAGAAAA CCGCTTTGG ATCTTAACCT CACTTGATT	660
TTTCCTTAT ACAAA	674

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 2853 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: BnM3.4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTTCCTAC CTTCATAAAT ATATATTGT	60
TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAAATCCTT TAGCTCAATG GTATAATGT TGTTGTTAG	120
ATTCAATAA CCCGGGTTCG AGTCATAGAC TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAAAGTGG	180
AACGCACATA TCGCTGACGT GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG	240
ATTAAAAGT GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT	300
ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCTT TTAAATCTTA ATAATAATAC CAGNGCTTT	360
ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT CTTTTTTTT GANCCGTTGA	420
TTGGTTTATG CTTATTGAA TGTNGCCNAC GTAAGAAATG AAGAACAAATT TATATTTGGA	480
GAAAATATAA TTTAATATGT TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA	540
TGGATGCGAG TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCCTTTCT CAAAAAGTAA	600
AATATTTGAT ATGTAACCTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAAATTA AATCAAAATA	660
GAAAAAAACTG ATAGTGATCT ACCCTTCAAC GTTTGAACT TATTCTTGGT TCACCCCCCTA	720
AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAATT TATTCTTCAAA TATTCTATAT CTTTAGAAA	780
GTGAAACAAA ATATTATCAA GTTATATTAT GTTTTCAAA TAAAAAGATA AAAAATAAAAT	840
AAAAAATAAT AGTAGTTACA AAAAAAAAAA ATTAATATTT TTACCAGCGT CANAAAACAC	900
TAAAACCTAA ACCCTAAATA TTAAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTG GATAATCTT	960
AAACATTAAA CATTAAAACA CTAACCCCTA AATCCTAAC TCTAAACCT TAAGTGTAA	1020
AATGTTTAGT GTTTTGATT TATAGTTAG GATTATCCA AAGGTTTAAG GTTTACCCAA	1080
GAGTTTATGG TTTAGGGATT ATGACTTAGG ATTTAGTGTGTT TTACTGACGA CGTTCAAAGT	1140
ATTTTTAAA AAATATTTT TTTGTAACAA CTACTATTT TATTTATTTT TTTACCTTT	1200
TATATTAAAA ACATAATATA ATTAATACT CCATCTGTT CATATTAAGT GTCATTGTAA	1260

CATTATTTT TTGTTACAAA AAAATTGTCA CTTTAGAATT CCAATGAAA ATTTATTTAT	1320
TTTCAGCTA AAATTAATTG CAAAGTGCAT TGATCTTATA AATAATTAA TTTATCTCAA	1380
ATGCTATATT GGTCAAACAT GTGTAATTAA TAGAAACTTA ATTATATTTC ATTTATTTTT	1440
TCTTAATCTG TGTAAAAATG TCÄAAGTAAA ATTTATTTAG AAACGAATTG AGTAATATTT	1500
TGTTTCATT TTTAAAAGAT ATCGAATATG AAATAACACA ATTTTATTGT ATGATGAACC	1560
TAAAAATTCA TCCTAAGAAG GTGAACGCAA GAATAAGTCA ACGBTGGG GAAAGCTAAC	1620
TATGGCCCAA AGTCATCAAA ATCTTCTTG TATTATCAA AATCCTTACA AATTAGTTA	1680
GAGTTAATAG ACCAAACACA TGATTATCAT CATATTAGAA TATTCTAAA AATTACTAGC	1740
GAATAATTAA AATCTTCTT TTATTATCA AAATCCTTAT AAAAACTTAT TTATATATAC	1800
TAAAACAATT TTAATTAAAA GAAAATAAGG GACCATGGAT ACATAAAAAT ATATGTTATT	1860
TCTTAAGATA GTGATAATAT TAATATATAC CAGTCCATAT ATTTATCAA ATAAATAATA	1920
TTTTTCGTAG TCCGATAATC ATTACTATAA ATTCACTAAA CCACATGTAG ATGTATATTT	1980
TATTTATATA TATATATATA AACCTAACG CCTTACCACT CGATAACCAT CAAAACCTTT	2040
CTTCTCGTT CGCTAACTCA AGGCTTCGAA AAGTAAAAAA ACAATGAAG AATGTCACAC	2100
TTGTTCTTGC TATGATCCTC TTCTTAAGCT GTGTCACATC CAAAGTTACA GCAACAGAAC	2160
TAGAGTCATC AACTAACCAA GAGCTCTTCC TATCGCGGCA CTTACCTCGC TTTCACCCCCA	2220
AGCAACATTG GCCGTTCCGT GGCTCCGAA AAGCCTTCCC TGCAGGCCAC TTCCGACTAA	2280
CTCCGTTCCA TCTGCCACAG GAAGTCACCA GATGCTTGAA CGACAAGAAC GAGGTAGGTA	2340
CATGTTTAA TGATATCGCT GAGACTTCT TCACCCAGGAA AGCCGCTATT GGATCGGAAT	2400
GTTGCGCCGC GATCAAGAAC ATGAACAAAG ATTGTGAGAA GACCGCTTT GGATCTTTC	2460
ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC CACCGTTGTT GGATCTACTT	2520
CACCTCCCTC TTCACAGGCT CCTTACATG CTCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC	2580
CTTCACATGC TCCTTCACAG GCTCCTTAA ATGCTCCTT AAATGCTCCT TTACATGCTC	2640
CTTTACATGC TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCTTC ACAGGCCCT TTACATGCTC	2700
CTTTACTGCC CCCTTCGAG GCTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT TTGATAGAAC	2760
TATTCAAGTA TTGATGTCCT AGGGAGTTT AGTTTTTTC TTGTTTAAA ATTTGTGTT	2820
TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTAA CTT	2853

REFERENCES

- 5 Atanassov I et al. (1996) Plant Science 118, 185-194
- Bechtold N. et al. (1993) Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences 316, 1194-1199
- 10 Koncz et al. 1986) Molecular General Genetics 204, 383-396
- Mariani et al. Nature 347(1990) 737-741
- Oldenhof M.T. et al. (1996) Plant Molecular Biology 31, 213-225
- 15 Siemens and Schieder 1996. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2, 66-75

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :
 - a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
 - b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
 - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 correspondant à tout ou partie :
 - a) de la séquence s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 2111, de préférence du nucléotide 1 au nucléotide 2084 de SEQ ID N° 3, ou
 - b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
 - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
- 15 3. Vecteur d'expression cellulaire comprenant une séquence selon la revendication 2 placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.
4. Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le produit cytotoxique est une protéase et de préférence une subtilisine.
- 20 5. Cellules de plante transformées par un vecteur selon la revendication 3 ou 4.
6. Plantes comprenant des cellules selon la revendication 5.
- 25 7. Plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.
- 30 8. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :

- l'insertion dans des plantes d'une lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et
- l'obtention de plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

5 9. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 8 comprenant les étapes de :

- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur selon la revendication 3 ou 4,
- b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la cytotoxicité du produit,
- c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
- d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
- e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).

15

10 10. Procédé d'obtention de plantes selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que, dans le cas où le produit cytotoxique est une subtilisine, l'induction de la fertilité consiste à appliquer à la plante une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés.

20

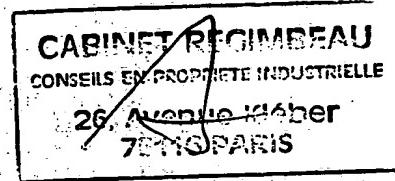
11. Procédé d'obtention de plantes hybrides caractérisé en ce qu'il comprend le croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 7 ou tel qu'obtenue par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 8 à 10 avec des plantes de lignée B d'intérêt agronomique.

25 12. Graines issues des plantes hybrides obtenues par la mise en œuvre du procédé selon la revendication 11.

30 13. Plantes selon la revendication 7 ou obtenues par la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisées en ce

qu'elles appartiennent à la famille des Brassicacées et de préférence en ce qu'il s'agit de colza.

ORIGINAL



- l'insertion dans des plantes d'une lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et
 - l'obtention de plantes ne produisant pas de gamètes mâles.
- 5 9. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 8 comprenant les étapes de :
- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur selon la revendication 3 ou 4,
 - b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la cytotoxicité du produit,
 - c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
 - d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
 - e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).
- 10 15 10. Procédé d'obtention de plantes selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que, dans le cas où le produit cytotoxique est une subtilisine, l'induction de la fertilité consiste à appliquer à la plante une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés.
- 20 11. Graines issues des plantes hybrides obtenues par croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 7 ou tel qu'obtenues par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 8 à 10 avec des plantes de lignée B d'intérêt agronomique.
- 25 12. Plantes selon la revendication 7 ou obtenues par la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisées en ce qu'elles appartiennent à la famille des Brassicacées et de préférence en ce qu'il s'agit de colza.
- 30

M3	M3.21	TCTTGCATAG ATTTTCCTCA TAAGATGTGT CACATCCAA GTCACAGCAA CAGAACTAGA GTCATCAACT AACCAAGAGC	80
M3	M3.21	TCTTCCATATC GCGGCACTTG CCTCGCTTTC ACCCCAAAGCC ACATGGCCG TTCTGGCT CGGAAAAGC CTTCCCTGCA	160
M3	M3.21	GGCACTTCC GACCAACTTC GTCATCTG CCACAGGAAG TCACAGGATG CTTGTCGGAC AGAAAGGG TAGGTACATG	240
M3	M3.21	TTTGTATGAT ATCGTTGAGA CTTTCTTCAC CAGGAAAGCC GTTATTGGAT CGGAATGTTG CGCCGCGATC AGAAAGATGA	320
M3	M3.21	ACAAAGATTG TGAGAAGCC GTCCTGGAT CTTCCTCAGA CCCCTTCCTG ACCGGCTATG TCAAGCTACA TTGCTCACC	400
M3	M3.21	ACAAAGATTG TGAGAAGCC GTCCTGGAT CTTCCTCAGA CCCCTTCCTG ACAGGCTATG TCAAACTACA TTGCTCACC	480
M3	M3.21	GTTGGTGGAT CTACTTCACC TCCTCTTCA CAGGCTCCTT TACATGCTCC TTCTCACAG GTCCTTCAC ATGCTCCTTC	560
M3	M3.21	ACATGCTCCT TCACAGGGTC CTTTAATGC TCTTTAAAT GTCCTTTAC ATGCTCCTTC ATGCTCCTTC	640
M3	M3.21	CCTTCACAG GCCCCCTTAC ATGCTCCTTC ATGCCCCCT TCAGGCTCCTT AGCTCCTTC ACAGGCTCCTT TTACATGCTC	720
M3	M3.21	CCTTCACAGG CCTTCACAG GCCCCCTTAC ATGCTCCTTC AGGCTCCTTC AGGCTCCTTC AGCTCCTTC AGCTCCTTC	800
M3	M3.21	TTTGAGAAAA CGGTCTTGG ATTAAACTT CACTTGATT TTTTCCCTTA TACAAATTAA ATTAGAGTT TACTTATAA	841
M3	M3.21	TTTGAGAAAA CGGTCTTGG ATCTAACTT CACTTGATT TTTTCCCTTA TACAAATTAA ATTAGAGTT TACTTATAA A	

FIGURE 1

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

FIGURE 2

1 GGATCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTTCTAC CTTCATAAAAT
 51 ATATATTTGT TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAACTCCTT TAGCTCAATG
 101 GTATAAATGT TGTTGTTAG ATTTCAATAA CCCGGGTTCG AGTCATAGAC
 151 TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAAAGTGG AACGCACATA TCGCTGACGT
 201 GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG ATTTAAAAGT
 251 GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT
 301 ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCCTT TTAAATCTTA ATAATAATAC
 351 CAGNGCTTT ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT
 401 CTTTTTTTT GANCGTTGA TTGGTTTATG CTTATTTGAA TGTNGCCNAC
 451 GTAAGAAATG AAGAACAAATT TATATTTGGA GAAAATATAA TTTAATATGT
 501 TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA TGGATGCGAG
 551 TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCTTTCT CAAAAAGTAA
 601 AATATTTGAT ATGTAACCTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAAATTAA
 651 AATCAAAATA GAAAAAACTG ATAGTGATCT ACCCTCAAC GTTTTGAAC
 701 TATTCTTGGT TCACCCCCCTA AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAAATT
 751 CATTATTGCA TATTCTATAT CTTTAGAAA GTGAAACAAA ATATTATCAA
 801 GTTATATTAT GTTTTCAAA TAAAAAGATA AAAAATAATT AAAAATAATT
 851 AGTAGTTACA AAAAAAAAATTAATTATTT TTACCAAGCGT CANAAAACAC
 901 TAAACCTAA ACCCTAAATA TTAAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTGT
 951 GATAAAATCTT AAACATTAAA CATTAAACCA CTAAACCTA AATCCTAAAC
 1001 TCTAAACCT TAAGTGTAA AATGTTAGT GTTTTGATT TATAGTTAG
 1051 GATTATCCA AAGGTTTAAG GTTACCCAA GAGTTATGG TTTAGGGATT
 1101 ATGACTTAGG ATTTAGTGTGTT TTACTGACGA CGTTCAAAGT ATTTTTTAA
 1151 AATATTTTT TTTGTAACAA CTACTATTT TATTTATTT TTTACCTTT
 1201 TATATTAAAA ACATAATATA ATTTAATACT CCATCTGTTT CATATTAAGT
 1251 GTCATTGTAA CATTATTTT TTGTTACAAA AAAATTGTCA CTTTAGAATT

FIGURE 2 (suite)

1301 CCAATGCAAA ATTTATTTAT TTTTCAGCTA AAATTAATTG CAAAGTGCAT
 1351 TGATCTTATA AATAATTTA TTTATCTCAA ATGCTATATT GGTCAAACAT
 1401 GTGTAATTAA TAGAAAACCTTA ATTATATTTTC ATTTATTTTT TCTTAATCTG
 1451 TGTA~~AAA~~ATG TCAAAGTAAA ATTTATTTAG AACGAATTG AGTAATATTT
 1501 TGTTTCATTT TTTAAAAGAT ATCGAATATG AAATAACACA ATTTTATTGT
 1551 ATGATGAACC TAAAAATTCA TCCTAAGAAG GTGAACGCAA GAATAAGTCA
 1601 ACGTTTG~~GG~~ GAAAGCTAAC TATGCCCAA AGTCATCAA ATCTTCTTG
 1651 TATTTATCAA AATCCTTACA AATTTAGTTA GAGTTAATAG ACCAAACACA
 1701 TGATTATCAT CATATTAGAA TATTCTAAAA AATTACTAGC GAATAATTAA
 1751 AATCTTCTT TTATTTATCA AAATCCTTAT AAAA~~C~~TTAT TTATATATAC
 1801 TAAAACAATT TTAATTAAAA GAAAATAAGG GACC~~T~~GGAT ACATAAAAAT
 1851 ATATGTTATT TCTTAAGATA GTGATAATAT TAATATATAC CAGTCCATAT
 1901 ATTTATCAA A~~T~~AAATAATA TTTTCGTAG TCCGATAATC ATTACTATAA
 1951 ATT~~C~~ATAAAAA CCACATGTAG ATGTATATT TATTTATATA TATATATATA
 2001 AACCC~~T~~AACG CCTTACCACT CGATAACC~~T~~ CAAA~~A~~CTTT CTTCTCGTTT
 2051 CGCTAACTCA AGGCTTCGAA AAGTAAAAAA AACAA~~T~~GAAG AATGTCACAC
 2101 TTGTTCTTGC TATGATCCTC TTCTTAAGCT GTGTCACATC CAAAGTTACA
 2151 GCAACAGAAC TAGAGTCATC AACTAACCAA GAGCTCTTCC TATCGCGGCA
 2201 CTTACCTCGC TTTCACCCCCA AGCAACATTG GCCGTTCCGT GGCTCCGGAA
 2251 AAGCCTTCCC TG~~C~~AGGCCAC TTCCGACTAA CTCCGTTCCA TCTGCCACAG
 2301 GAAGTCACCA GATGCTTGAA CGACAAGAAG GAGGTAGGTA CATGTTTAA
 2351 TGATATCGCT GAGACTTTCT TCACCAGGAA AGCCGCTATT GGATCGGAAT
 2401 GTTGC~~G~~CCGC GATCAAGAAG ATGAACAAAG ATTGTGAGAA GACCGTCTT
 M3 TTT
 2451 GGATCTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC
 M3 GGATCTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC
 2501 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTACATG
 M3 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTACATG

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

2551 CTCCTTCTTC ACAGGGCTCCT TCACATGCTC CTTCACATGC TCCTTCACAG
M3 CTCCTTCTTC ACAGGGCTCCT TCACATGCTC CTTCACATGC TCCTTCACAG

2601 GCTCCTTAA ATGCTCCTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC
M3 GCTCCTTAA ATGCTCCTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC

2651 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCCCTC ACAGGGCCCT TTACATGCTC
M3 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCCCTC ACAGGGCCCT TTACATGCTC

2701 CTTTAUTGCC CCCTTCGCAG GCTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT
M3 CTTTAUTGCC CCCTTCGCAG GCTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT

2751 TTGATAGAAT TATTCAAGTA TTGATGTCCT AGGGAGTTT AGTTTTTTTC
M3 TTGATAGAAT TACTCAAGTA ATGATGCCCT AGGGAGTTG AGTTTTCTC

2801 TTGTTTTAAA ATTTTGTGTT TATTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTAA
M3 GTGTTTTAAA GTTTGTGTT TATTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTAA

2851 CTT
M3 CTT

FIGURE 2 (suite)

A B C D E F G H

1 kb —

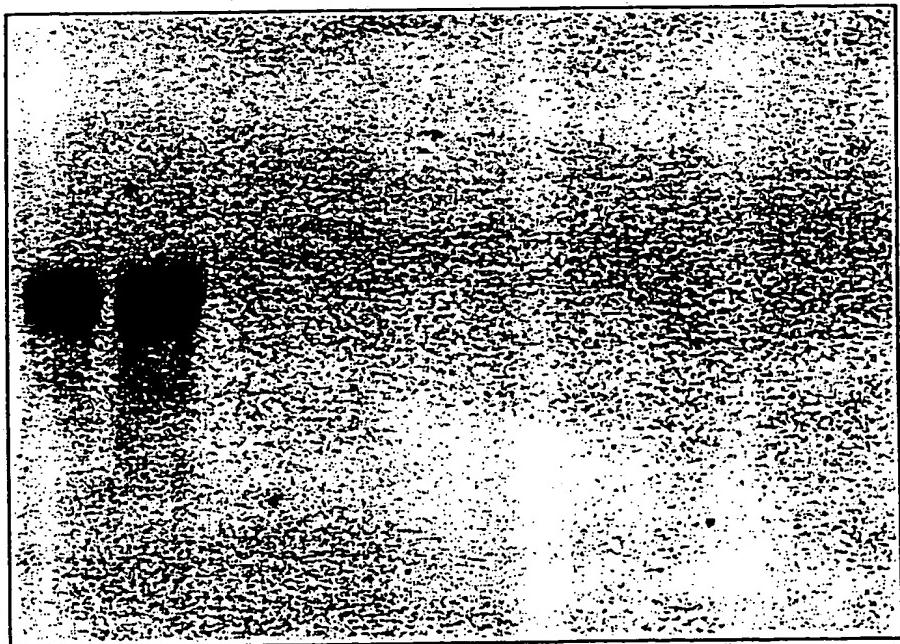


FIGURE 3

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

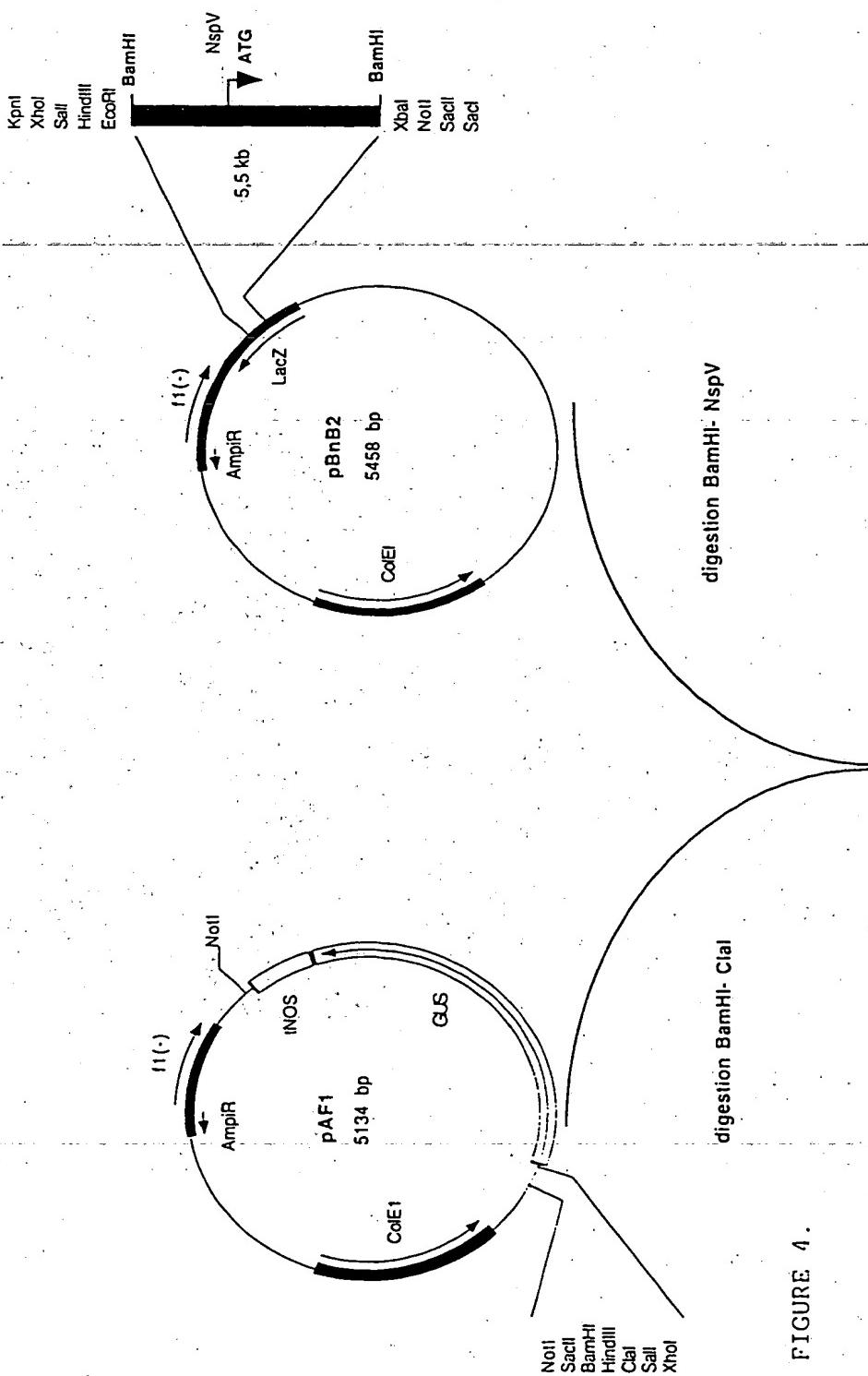


FIGURE 4.

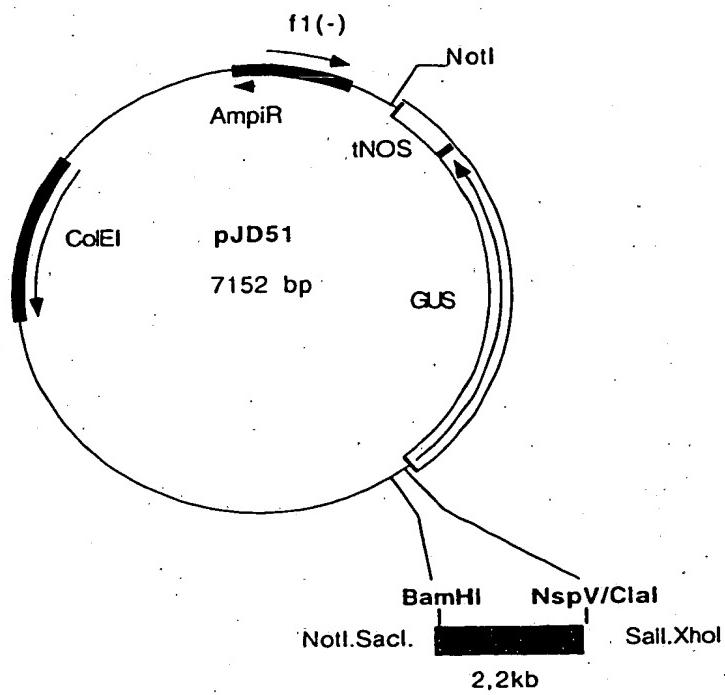


FIGURE 4 (suite)

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

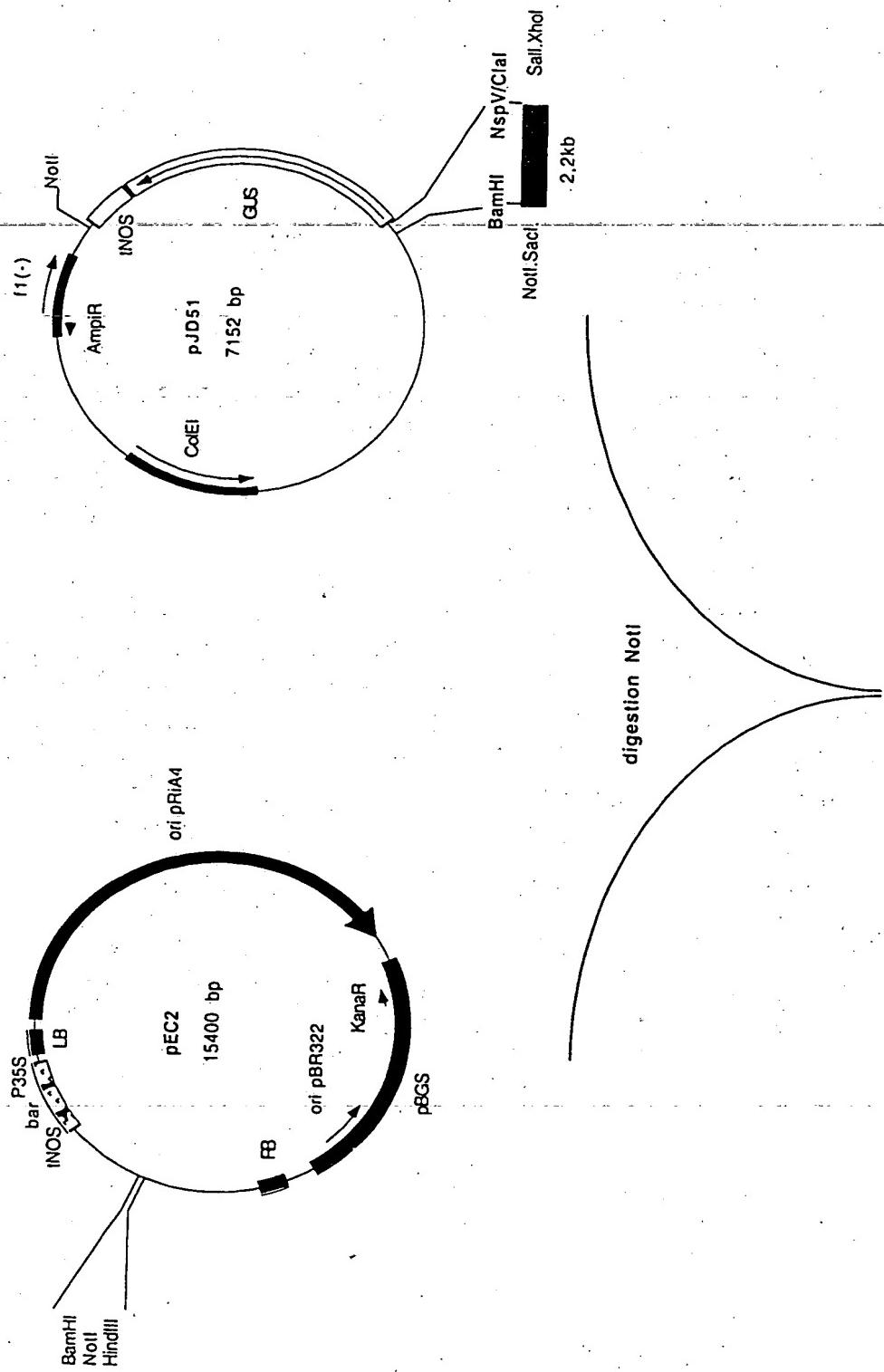


FIGURE 5.

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

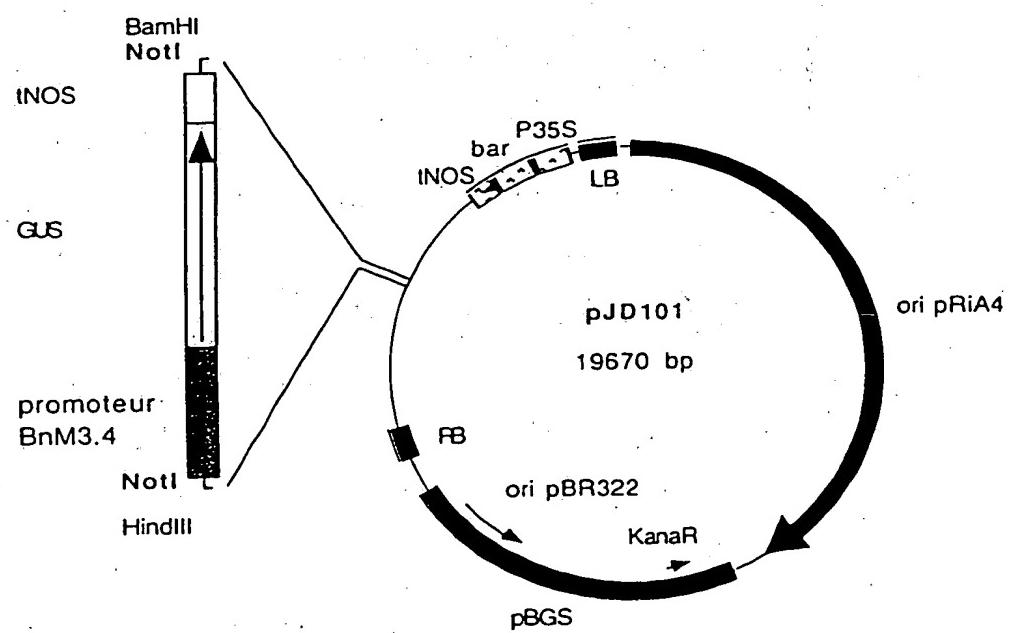


FIGURE 5 (suite)

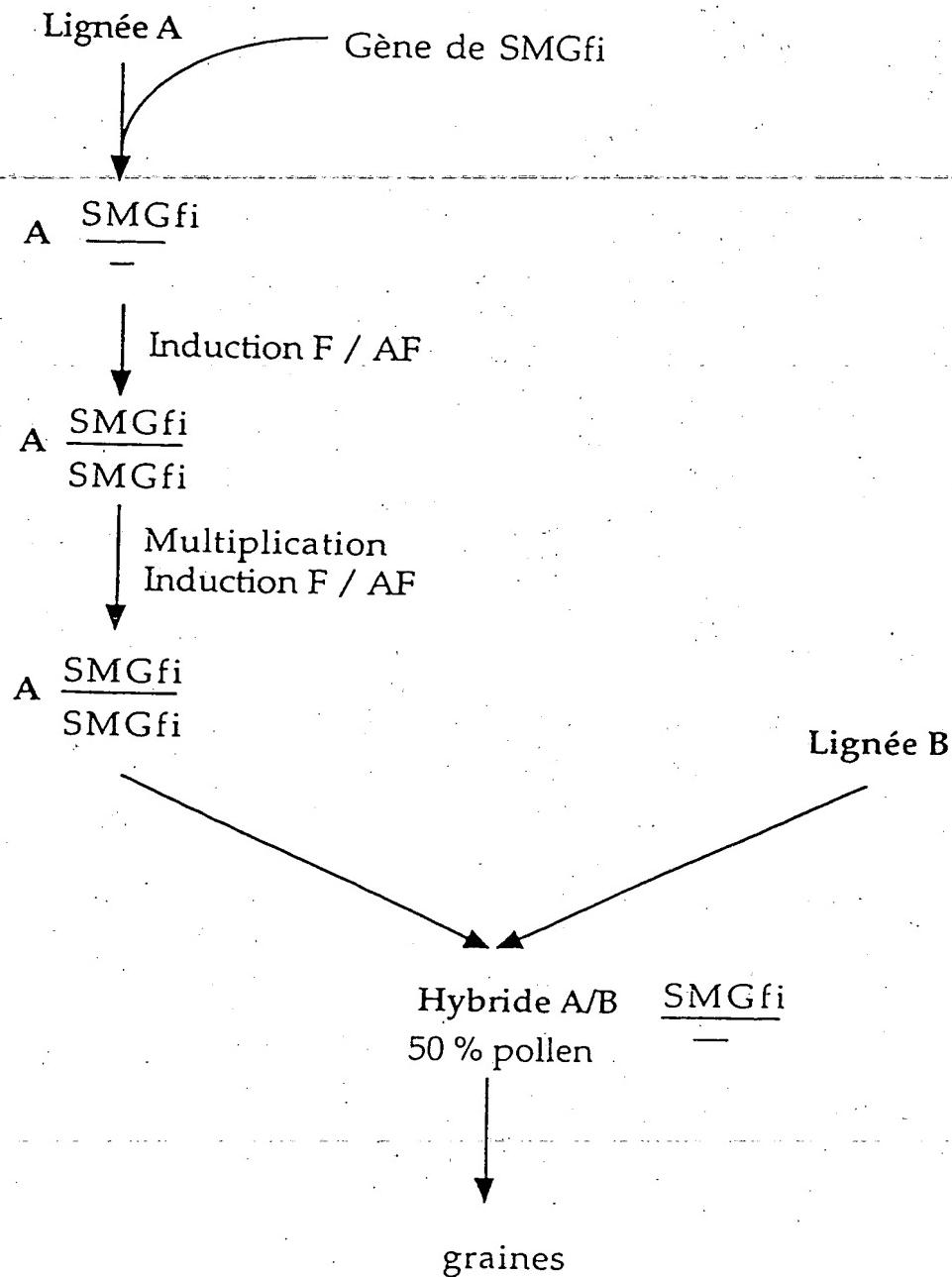


FIGURE 6